



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|--|-----------|---|
| (51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/53, 15/82, 5/10, A01H 5/00 | A2 | (11) Numéro de publication internationale: WO 96/38567 |
| | | (43) Date de publication internationale: 5 décembre 1996 (05.12.96) |

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00831

(22) Date de dépôt international: 3 juin 1996 (03.06.96)

(30) Données relatives à la priorité:

| | | |
|----------|-----------------------------|----|
| 95/06800 | 2 juin 1995 (02.06.95) | FR |
| 95/13570 | 10 novembre 1995 (10.11.95) | FR |
| 96/05944 | 17 mai 1996 (17.05.96) | FR |

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC AGROCHIMIE [FR/FR]; 14-20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SAILLAND, Alain [FR/FR]; 38, rue Ernest-Fabrègue, F-69009 Lyon (FR). ROLLAND, Anne [FR/FR]; 41, rue Louis-Bouquet, F-69009 Lyon (FR). MATRINGE, Michel [FR/FR]; 5, chemin de Montpellas, F-69009 Lyon (FR). PALLETT, Ken [GB/GB]; Ongar, Essex CM5 0HW (GB).

(74) Mandataire: CHRETIEN, François; Rhône-Poulenc Agrochimie, 14-20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).

(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.

(54) Title: DNA SEQUENCE OF A GENE OF HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE AND PRODUCTION OF PLANTS CONTAINING A GENE OF HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE AND WHICH ARE TOLERANT TO CERTAIN HERBICIDES

(54) Titre: SEQUENCE ADN D'UN GENE DE L'HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE ET OBTENTION DE PLANTES CONTENANT UN GENE DE L'HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE, TOLERANTES A CERTAINS HERBICIDES

(57) Abstract

DNA sequence of a gene of hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase and production of plants containing a gene of hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase and which are resistant to herbicides. DNA sequence of a gene of hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase; isolation from a bacteria or a plant; utilization for obtaining plants tolerant to herbicides.

(57) Abrégé

Séquence ADN d'un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase et obtention de plantes contenant un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase, résistantes aux herbicides. Séquence ADN d'un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase; isolement à partir d'une bactérie ou d'une plante; utilisation pour l'obtention de plantes tolérantes aux herbicides.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Arménie | GB | Royaume-Uni | MW | Malawi |
| AT | Autriche | GE | Géorgie | MX | Mexique |
| AU | Australie | GN | Guinée | NE | Niger |
| BB | Barbade | GR | Grèce | NL | Pays-Bas |
| BE | Belgique | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BF | Burkina Faso | IE | Irlande | NZ | Nouvelle-Zélande |
| BG | Bulgarie | IT | Italie | PL | Pologne |
| BJ | Bénin | JP | Japon | PT | Portugal |
| BR | Brésil | KE | Kenya | RO | Roumanie |
| BY | Bélarus | KG | Kirghizistan | RU | Fédération de Russie |
| CA | Canada | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CF | République centrafricaine | KR | République de Corée | SE | Suède |
| CG | Congo | KZ | Kazakhstan | SG | Singapour |
| CH | Suisse | LI | Liechtenstein | SI | Slovénie |
| CI | Côte d'Ivoire | LK | Sri Lanka | SK | Slovaquie |
| CM | Cameroun | LR | Libéria | SN | Sénégal |
| CN | Chine | LT | Lituanie | SZ | Swaziland |
| CS | Tchécoslovaquie | LU | Luxembourg | TD | Tchad |
| CZ | République tchèque | LV | Lettonie | TG | Togo |
| DE | Allemagne | MC | Monaco | TJ | Tadjikistan |
| DK | Danemark | MD | République de Moldova | TT | Trinité-et-Tobago |
| EE | Estonie | MG | Madagascar | UA | Ukraine |
| ES | Espagne | ML | Mali | UG | Ouganda |
| FI | Finlande | MN | Mongolie | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FR | France | MR | Mauritanie | UZ | Ouzbékistan |
| GA | Gabon | | | VN | Viet Nam |

Séquence ADN d'un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase et obtention de plantes contenant un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase, tolérantes à certains herbicides.

5

La présente invention concerne un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD), un gène chimère contenant ce gène comme séquence codante et son utilisation pour l'obtention de plantes résistantes à certains herbicides.

On connaît certains herbicides tels que les isoxazoles décrites notamment dans les demandes de brevets français 95 06800 and 95 13570 et notamment l'isoxaflutole, herbicide sélectif du maïs, les dicétonitriles tels que ceux décrits dans les demandes européennes 0 496 630, 0 496 631, en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-CF₃ phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO CH₃-2,3 Cl₂ phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones décrites dans les demandes européennes 0 625 505 et 0 625 508, en particulier la sulcotrione. Cependant aucun gène de tolérance à de tels herbicides n'a été décrit.

L'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase est une enzyme qui catalyse la réaction de transformation du para-hydroxy-phényl-pyruvate en homogentisate.

Par ailleurs, la séquence en acides aminés de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase issue de *Pseudomonas* sp. P.J. 874 a été décrite, sans qu'il y ait une description de son rôle dans la tolérance des plantes aux herbicides (Rüetschi et col: Eur. J. Biochem. 205, 459-466, 1992). Ce document ne donne pas de description du gène codant pour cette protéine.

Il a maintenant été découvert la séquence d'un gène de ce type et qu'une telle séquence pouvait, une fois incorporée dans des cellules végétales, fournir une surexpression ou une activation de l'HPPD dans les plantes conférant à ces dernières une tolérance intéressante à certains herbicides récents, tels que ceux de la famille des isoxazoles ou de celle des tricétones.

La présente invention a pour objet une séquence d'ADN d'un gène d'origine non humaine et d'une origine bactérienne non marine, ou encore d'un gène de plante, isolée ou une séquence pouvant s'hybrider avec cette séquence isolée, caractérisé en ce qu'elle exprime une hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD).

Plus particulièrement cette séquence peut être d'origine bactérienne, telle que notamment le genre *Pseudomonas* ou encore d'origine végétale, telle que notamment de plante monocotylédone ou dicotylédone, notamment d'*Arabidopsis* ou d'ombellifères comme par exemple la carotte (*Daucus carotta*). Elle peut être native ou sauvage ou éventuellement mutée tout en gardant fondamentalement une propriété de tolérance

herbicide contre les inhibiteurs de l'HPPD, tels que les herbicides de la famille des isoxazoles ou de celle des tricétones.

L'invention comprend également un procédé d'isolement du gène ci-dessus, caractérisé en ce que:

- on choisit, comme amorces, quelques oligonucléotides issus de la séquence en acides aminés d'une HPPD,
- à partir de ces amorces, on synthétise des fragments d'amplification par PCR
- on isole le gène par création et criblage d'une banque génomique et
- on clone le gène.

De préférence on utilise des amorces issues de la séquence de l'HPPD d'une bactérie du genre *Pseudomonas*. De manière particulièrement préférée, elles sont issues de *Pseudomonas fluorescens*.

L'invention a encore pour objet l'utilisation d'un gène codant pour l'HPPD dans un procédé pour la transformation des plantes, comme gène marqueur ou comme séquence codante permettant de conférer à la plante une tolérance à certains herbicides. Il peut également être utilisé en association avec d'autres gènes marqueurs et/ou séquence codante pour une propriété agronomique.

Le gène codant peut être de toute origine, natif ou sauvage ou éventuellement muté tout en gardant fondamentalement une propriété de tolérance herbicide contre les inhibiteurs de l'HPPD, tels que les herbicides de la famille des isoxazoles ou de celle des tricétones. Comme séquence codante on peut notamment utiliser celle selon l'invention telle que décrite ci-dessus.

La transformation des cellules végétales peut être obtenue par tout moyen connu approprié. Une série de méthodes consiste à bombardier des cellules ou des protoplastes avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN.

Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante d'un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*.

La présente invention a encore pour objet un gène chimère comprenant, dans le sens de la transcription, au moins une séquence de régulation promotrice, une séquence codante hétérologue qui exprime l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase et au moins une séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation.

Comme séquence de régulation promotrice on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur d'origine bactérienne, virale ou végétale tel que, par exemple, celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase (RuBisCO) ou de celui d'un gène de l' α tubuline (Demande européenne EP n° 0 652 286), ou encore d'un gène de virus de plante tel que, par

exemple, celui de la mosaïque du chou fleur (CAMV 19S ou 35S), mais tout promoteur convenable connu peut être utilisé. De préférence on a recours à une séquence de régulation promotrice qui favorise la surexpression de la séquence codante, tel que par exemple, celle comprenant au moins un promoteur d'histone tel que décrit dans la

5 demande européenne EP 0507698.

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription "enhancer", comme par exemple l'activateur de translation du virus etch du tabac (TEV) décrit dans la demande

10 WO87/07644, ou des peptides de transit, soit simples, soit doubles, et dans ce cas éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est à dire comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie

15 mature N terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale. constituée d'une partie de séquence de la partie

mature N terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, tels que décrit dans la demande européenne n° 0 508 909.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser

20 toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande européenne EP n° 0 633 317.

La présente invention a encore pour objet les cellules végétales, de plantes monocotylédones ou dicotylédones, notamment des cultures, transformées selon l'un des

25 procédés décrits ci-dessus et contenant dans leur génome une quantité efficace d'un gène exprimant l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD). On a observé que des plantes transformées de cette façon présentent une tolérance importante à certains herbicides récents tels que les isoxazoles décrites notamment dans les demandes de brevets français 9506800 and 95 13570 et notamment du 4-[4-CF₃-2-(méthylsulfoyl) benzoyl]-5-

30 cyclopropyl isoxazole, et notamment l'isoxaflutole, herbicide sélectif du maïs, , les dicétonitriles tels que ceux décrits dans les demandes européennes 0 496 630, 0 496 631, en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-CF₃ phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-2,3 Cl₂ phényl) propane-1, 3-dione, les

35 tricétones décrites dans les demandes européennes 0 625 505 et 0 625 508, en particulier la sulcotrione.

L'invention a enfin pour objet un procédé de désherbage de plantes, notamment de cultures, à l'aide d'un herbicide de ce type, caractérisé en ce qu'on applique cet herbicide

sur des plantes transformées selon l'invention, tant en présemis, en prélevée qu'en postlevée de la culture.

L'invention a encore pour objet l'utilisation du gène HPPD comme gène marqueur au cours du cycle "transformation-régénération" d'une espèce végétale et sélection sur

5 l'herbicide ci-dessus

Les différents aspects de l'invention seront mieux compris à l'aide des exemples expérimentaux ci-dessous.

Exemple 1: Isolement du gène de l'HPPD de *P. fluorescens* A32.

10 A partir de la séquence en acides aminés de l'HPPD de *Pseudomonas* sp. P.J. 874 (publié par Rüetschi U. et al. 1992. Eur. J. Biochem. 205: 459-466), on déduit la séquence de différents oligonucléotides pour amplifier par PCR une partie de la séquence codante de l'HPPD de *P. fluorescens* A32 (isolée par McKellar, R.C. 1982. J. Appl Bacteriol. 53:305-316). Un fragment d'amplification du gène de cette HPPD a été utilisé pour cribler une
15 banque génomique partielle de *P. fluorescens* A32 et ainsi isoler le gène codant pour cette enzyme.

A) Préparation de l'ADN génomique de *P. fluorescens* A32.

La bactérie a été cultivée dans 40 ml de milieu minimum M63 (KH₂PO₄ 13,6g/l, (NH₄)₂SO₄ 2g/l, MgSO₄ 0,2g/l, FeSO₄ 0,005 g/l pH7 plus L-tyrosine 10mM comme
20 seule source de carbone) à 28°C pendant 48 heures.

Après lavage, les cellules sont reprises dans 1 ml de tampon de lyse (tris HCl 100 mM pH 8,3, NaCl 1,4 M et EDTA 10 mM) et incubées 10 minutes à 65°C. Après un traitement au phénol/chloroforme (24/1) et un traitement au chloroforme, les acides nucléiques sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol puis repris dans 300 µl d'eau stérile et
25 traités à la RNase 10 µg/ml final. L'ADN est de nouveau traité au phénol/chloroforme, chloroforme et reprécipité par addition de 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M pH5 et 2 volumes d'éthanol. L'ADN est ensuite repris dans de l'eau stérile et dosé.

B) Choix des oligonucléotides et synthèses.

A partir de la séquence en acides aminés de l'HPPD de *Pseudomonas* sp. P.J. 874 on
30 choisit cinq oligonucléotides, deux dirigés dans le sens NH₂ terminal de la protéine vers le COOH terminal de la protéine et trois dirigés dans le sens inverse (voir figure 1). Le choix a été dicté par les deux règles suivantes:

-une extrémité 3' de l'oligonucléotide stable, c'est à dire au moins deux bases sans ambiguïté.

35 -une dégénérescence la plus faible possible.

Les oligonucléotides choisis ont les séquences suivantes:

P1: 5'TA(C/T)GA(G/A)AA(C/T)CCIATGGG3'

P2: 5'GA(G/A)ACIGGICCIATGGA3'

P3: 5'AA(C/T)TGCATIA(G/A)(G/A)AA(C/T)TC(C/T)TC3'

P4: 5'AAIGCIAC(G/A)TG(C/T)TG(T/G/A)ATICC3'

P5: 5'GC(C/T)TT(A/G)AA(A/G)TTICC(C/T)TCICC3'

Ils ont été synthétisés sur le synthétiseur "Cyclone plus DNA Synthesizer" de marque
5 MILLPORE.

Avec ces cinq oligonucléotides par PCR les fragments d'amplification que l'on doit
obtenir théoriquement d'après la séquence SEQ ID N°1 ont les tailles suivantes:

- avec les amorces P1 et P3 -----> environ 690 bp
- avec les amorces P1 et P4 -----> environ 720 bp
- 10 avec les amorces P1 et P5 -----> environ 1000 bp
- avec les amorces P2 et P3 -----> environ 390 bp
- avec les amorces P2 et P4 -----> environ 420 bp
- avec les amorces P2 et P5 -----> environ 700 bp

C) Amplification d'une partie codante de l'HPPD de *P. fluorescens* A32.
15 Les amplifications ont été faites sur un appareil PCR PERKIN ELMER 9600 et avec
la Taq polymérase PERKIN ELMER avec son tampon dans les conditions standards, c'est
à dire pour 50µl de réaction il y a les dNTP à 200µM, les primers à 20µM, la Taq
polymérase 2,5 unités et l'ADN de *P. fluorescens* A32 2,5 µg.

Le programme d'amplification utilisé est, 5 min à 95°C puis 35 cycles <45 sec 95°C,
20 45 sec 49°C, 1 min 72°C> suivis de 5 min à 72°C.

Dans ces conditions, tous les fragments d'amplification obtenus ont une taille
compatible avec les tailles théoriques données au-dessus, ce qui est une bonne indication
de la spécificité des amplifications.

Les fragments d'amplifications obtenus avec les jeux d'amorces P1/P4, P1/P5 et P2/P4
25 sont ligués dans pBSII SK(-) après digestion de ce plasmide par Eco RV et traitement à la
terminal transférase en présence de ddTTP comme décrit dans HOLTON T.A. and
GRAHAM M.W. 1991. N.A.R. vol 19, n°5 p1156.

Un clone de chacun des trois types est séquencé partiellement; ceci permet de
confirmer qu'on a bien amplifié dans les trois cas une partie de la région codante de l'HPPD
30 de *P. fluorescens* A32. Le fragment P1/P4 est retenu comme sonde pour cribler une banque
génomique partielle de *P. fluorescens* A32 et isoler le gène complet de l'HPPD.

D) Isolement du gène.

Par Southern on montre qu'un fragment de 7 Kbp après digestion de l'ADN de *P.*
35 *fluorescens* A32 par l'enzyme de restriction BamHI s'hybride avec la sonde HPPD P1/P4.
On a donc fait digérer 400µg d'ADN de *P. fluorescens* A32 par l'enzyme de restriction
BamHI et purifier sur gel d'agarose les fragments d'ADN faisant environ 7Kbp.

Ces fragments sont ligués dans pBSII SK(-), lui-même digéré par Bam HI et déphosphorylé par traitement à la phosphatase alcaline. Après transformation dans *E. coli* DH10b, la banque génomique partielle est criblée avec la sonde HPPD P1/P4.

Un clone positif a été isolé et appelé pRP A. Sa carte simplifiée est donnée figure 2. Sur cette carte est indiqué la position de la partie codante du gène HPPD. Elle est composée de 1077 nucléotides qui codent pour 358 acides aminés (voir SEQ ID N° 1). L'HPPD de *P. fluorescens* A32 présente une bonne homologie en acides aminés avec celle de *Pseudomonas* sp. strain P.J. 874, il y a en effet 92% d'identité entre ces deux protéines (voir figure 3).

Exemple 2: Construction de deux gènes chimères.

Pour conférer la tolérance de plantes aux herbicides inhibant l'HPPD, on construit deux gènes chimères:

Le premier consiste à mettre la partie codante du gène de l'HPPD de *P. fluorescens* A32 sous le contrôle du promoteur double histone (Demande de Brevet européen N° 0 507 698) suivi du Tobacco etch virus translational enhancer (TEV) (pRTL-GUS (Carrington and Freed, 1990; J. Virol. 64: 1590-1597)) avec le terminateur du gène de la nopaline synthase. L'HPPD sera alors localisée dans le cytoplasme.

Le deuxième sera identique au premier, à ceci près qu'entre l'activateur de translation TEV et la partie codante de l'HPPD, on intercale le peptide de transit optimisé (OTP) (Demande européenne EP n° 0 508 909). L'HPPD sera alors localisée dans le chloroplaste.

A) Construction du vecteur pRPA-RD-153:

- pRPA-RD-11 Un dérivé de pBS-II SK(-) (Stratagene catalog #212206) contenant le site de polyadénylation de la nopaline synthase (NOS polyA) (Demande européenne EP n° 0 652 286) est cloné entre les sites *KpnI* et *Sall*. Le site *KpnI* est transformé en un site *NotI* par traitement avec la T4 ADN polymérase I en présence de 150 µM de deoxynucleotide triphosphates puis ligation avec un linker *NotI* (Stratagene catalog #1029). Ainsi on obtient une cassette de clonage NOS polyA .

- pRPA-RD-127: Un dérivé de pRPA-BL-466 (Demande européenne EP n° 0 337 899) cloné dans pRPA-RD-11 créant une cassette d'expression du gène *oxy* et contenant le promoteur de la petite sous unité de la ribulose-biscarboxylase:

" promoter (SSU) - *oxy* gene - NOS polyA"

Pour créer ce plasmide, pRPA-BL-488 a été digéré avec *XbaI* et *HindIII* pour isoler un fragment de 1.9 kbp contenant le promoteur SSU et le gène *oxy* qui a été ligué dans le plasmide pRPA-RD-11 digéré avec des enzymes compatibles.

- pRPA-RD-132: C'est un dérivé de pRPA-BL-488 (Demande européenne EP n° 0 507 698) cloné dans pRPA-RD-127 avec création d'une cassette d'expression du gène *oxy* avec le promoteur double histone:

" promoteur double histone - *oxy* gene - NOS polyA "

5 Pour fabriquer ce plasmide, pRPA-BL-466 est digéré par HindIII, traité par la Klenow puis redigéré avec NcoI. Le fragment de 1.35 kbp purifié contenant le promoteur double histone H3A748 est ligué avec le plasmide pRPA-RD-127 qui avait été digéré par XbaI, traité Klenow et redigéré par NcoI.

10 - pRPA-RD-153: C'est un dérivé de pRPA-RD-132 contenant l'activateur de translation du virus du tabac (TEV). pRTL-GUS (Carrington and Freed, 1990; J. Virol. 64: 1590-1597) est digéré avec *NcoI* et *EcoRI* et le fragment de 150 bp est ligué dans pRPA-RD-132 digéré avec les mêmes enzymes. Donc on a créé une cassette d'expression contenant le promoteur:

"double histone promoter - TEV -*oxy* gene - NOS polyA"

15 B) Construction du vecteur pRPA-RD-185:

pUC19/GECA: Un dérivé de pUC-19 (Gibco catalog #15364-011) contenant de nombreux sites de clonage. pUC-19 est digéré avec *EcoRI* et ligué avec l'oligonucléotide linker 1:

20 Linker 1: AATTGGGCCA GTCAGGCCGT TTAAACCCTA GGGGGCCCCG
CCCGGT CAGTCCGGCA AATTTGGGAT CCCCCGGGC TTAA

Le clone sélectionné contient un site *EcoRI* suivi du polylinker qui contient les sites suivants: *EcoRI*, *Apal*, *AvrII*, *PmeI*, *SfiI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *Sall*, *PstI*, *SphI* et *HindIII*.

25 pRPA-RD-185: c'est un dérivé de pUC19/GECA contenant un polylinker modifié. pUC19/GECA est digéré par HindIII et ligué avec l'oligonucléotide linker 2:

Linker 2: AGCTTTTAAT TAAGGCGCGC CCTCGAGCCT GGTTTCAGGG
AAATTA ATTCCGCGCG GGAGCTCGGA CCAAGTCCC TCGA

30 Le clone sélectionné contient un site *HindIII* site au milieu du polylinker qui contient maintenant les sites suivants: *EcoRI*, *Apal*, *AvrII*, *PmeI*, *SfiI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *Sall*, *PstI*, *SphI*, *HindIII*, *PacI*, *AscI* *XhoI* et *EcoNI*.

C) Construction du vecteur pRP T:

- pRP O: un dérivé de pRPA-RD-153 contenant une cassette d'expression de l'HPPD, promoteur double histone - TEV - gène HPPD - terminateur Nos. Pour fabriquer pRP O,

pRPA-RD153 est digéré par Hind III, traité par la Klenow puis redigéré par NcoI pour enlever le gène *oxy* et le remplacer par le gène HPPD sorti du plasmide pRP A par digestion BstEII, traitement par la Klenow et redigestion par NcoI.

- 5 - pRP R: pour l'obtenir le plasmide pRP O a été digéré par PvuII et SacI, le gène chimère a été purifié puis ligué dans pRPA-RD-185 lui-même digéré par PvuII et SacI.

- pRP T: il a été obtenu par ligation du gène chimère sorti de pRP R après digestion par SacI et HindIII dans le plasmide pRPA-BL 150 alpha2 digéré par les mêmes enzymes (Demande européenne EP n° 0 508 909).

Le gène chimère du vecteur pRP T a donc la structure suivante:

10

| | | | |
|-----------------------------|-----|-----------------------------|--------------------|
| Promoteur double histone | TEV | Région codante de l'HPPD | Terminateur nos |
|-----------------------------|-----|-----------------------------|--------------------|

D) Construction du vecteur pRP V

- 15 - pRP P: c'est un dérivé de pRPA-RD-7 (Demande européenne EP n° 0 652 286) contenant le peptide de transit optimisé suivi du gène de l'HPPD. Il a été obtenu par ligation de la partie codante de l'HPPD sorti de pRP A par digestion BstEII et NcoI, traitement à la Klenow et du plasmide pRPA-RD-7 lui-même digéré SphI et AccI et traité à la DNase polymérase T4.

- 20 - pRP Q: un dérivé de pRPA-RD-153 contenant une cassette d'expression de l'HPPD, promoteur double histone - TEV - OTP - gène HPPD - terminateur Nos. Pour le construire le plasmide pRPA-RD-153 est digéré par Sal I, traité par la Klenow puis redigéré par NcoI pour enlever le gène *oxy* et le remplacer par le gène HPPD sorti du plasmide pRP P par digestion BstEII, traitement par la Klenow et redigestion par NcoI.

- pRP S: pour l'obtenir, le plasmide pRP Q a été digéré par PvuII et SacI pour sortir le gène chimère qui a été ligué dans pRPA-RD-185 lui-même digéré par PvuII et SacI.

- 25 - pRP V: il a été obtenu par ligation du gène chimère sorti de pRP S après digestion par SacI et HindIII dans le plasmide pRPA-BL 150 alpha2 (Demande européenne EP n° 0 508 909).

Le gène chimère du vecteur pRP Q a donc la structure suivante:

| | | | | |
|-----------------------------|-----|-----|--------------------------|-----------------|
| Promoteur double histone | TEV | OTP | Région codante de l'HPPD | Terminateur nos |
|-----------------------------|-----|-----|--------------------------|-----------------|

Exemple 3: Transformation du tabac industriel PBD6.

Afin de déterminer l'efficacité de ces deux gènes chimériques, ceux-ci ont été transférés dans du tabac industriel PBD6 selon les procédures de transformation et de régénération déjà décrites dans la demande européenne EP n° 0 508 909.

1) Transformation:

Le vecteur est introduit dans la souche non oncogène d'*Agrobacterium* EHA 101 (Hood et al, 1987) porteuse du cosmide pTVK 291 (Komari et al, 1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh R. et al. (1985) Science, 227, 1229-1231.

2) Régénération:

La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30g/l de saccharose ainsi que 200ug/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur des plants en serre ou in vitro et transformés selon la technique des disques foliaires (Science 1985, Vol 227, p. 1229-1231) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu MS additionné de 30g/l de saccharose contenant 0.05mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées par culture sur un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone, pendant 10 jours. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucres et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

Exemple 4: Mesure de la tolérance du tabac au 4-[4-CF₃-2-(méthylsulfonyl) benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole: traitement de postlevée.

Au sortir de l'in-vitro, les plantules de tabac transformées ont été acclimatées à la serre (60% d'humidité relative; température: 20°C la nuit et 23°C la jour) pendant cinq semaines puis traitées au 4-[4-CF₃-2-(méthylsulfonyl)benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole.

Le tabac témoin, non transformé et traité au 4-[4-CF₃-2-(méthylsulfonyl)benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole à des doses allant de 50 à 400 g/ha, développe en environ 72 heures des chloroses, qui s'intensifient pour évoluer vers des nécroses très prononcées en une semaine (couvrant environ 80% des feuilles terminales).

Après transformation ce même tabac, qui surexprime l'HPPD de *P. fluorescens*, est très bien protégé contre un traitement au 4-[4-CF₃-2-(méthylsulfonyl)benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole à la dose de 400 g/ha.

Si l'enzyme surexprimée est dans le cytoplasme, c'est à dire si la transformation a été faite avec le gène porté par le vecteur pRP T, alors la plante présente de très légères chloroses toutes localisées sur les feuilles intermédiaires.

- 5 Si l'enzyme surexprimée est dans le chloroplaste, c'est à dire si la transformation a été faite avec le gène porté par le vecteur pRP V, alors la plante est parfaitement protégée, ne présente aucun symptôme.

Exemple 5: Mesure de la tolérance du tabac au 4-[4-CF₃-2-(méthylsulfoyl) benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole: traitement de prélevée

- 10 a) test in vitro:

On utilise des graines de tabac récoltées à partir des plantes issues du cycle "transformation - régénération" résistantes à un traitement foliaire d'isoxaflutole à la dose de 400g/h décrites aux exemples 1 à 3.

- 15 Ces graines ont été semées sur des boîtes contenant du phytagar à 10 g/l et de l'isoxaflutole à différentes concentrations allant de 0 à 1 mg/l. La germination a été faite ensuite à 25°C avec une photopériode de 12 heures de lumière/12 heures d'obscurité.

- 20 Selon ce protocole des graines de tabacs sauvages ont été mises à germer ainsi que des graines des deux types de tabacs transgéniques c'est à dire tabacs CY, avec localisation de l'HPPD dans le cytoplasme, et les tabacs CO avec localisation de l'HPPD dans le chloroplaste.

Les mesures de résistances sont faites visuellement entre 2 et 3 semaines après le semis.

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous.

25

| concentration en isoxaflutole | Tabac sauvage | Tabac CY | Tabac CO |
|----------------------------------|--|--|--|
| 0 mg/l | 100% des graines germent sans symptômes° | 100% des graines germent sans symptômes° | 100% des graines germent sans symptômes |
| 0,05 mg/l | 20% des graines germent et présentent des symptômes° | 75% des graines germent* sans symptômes° | 75% des graines germent* sans symptômes° |
| 0,1 mg/l | pas de germination | 75% des graines germent* sans symptômes° | 75% des graines germent* sans symptômes° |

| | | | |
|----------|--------------------|---|--|
| 0,5 mg/l | pas de germination | 75% des graines germent* sans symptômes° | 75% des graines germent* sans symptômes° |
| 1 mg/l | pas de germination | 75% des graines germent* avec légers symptômes° | 75% des graines germent* sans symptômes° |

° les symptômes que présentent les plantules en cours de germination sont des déformations des cotylédons plus ou moins importantes et surtout un blanchiment des tissus normalement photosynthétiques et donc verts.

5

* 75% des graines germent car ont été semées des graines issues de l'autofécondation de plantes mono-locus sortant du cycle "transformation - régénération" ne portant donc le gène de tolérance que sur un chromosome.

En opérant de la même manière avec les produits suivants produit n° 51 du brevet

10 américain 4 780 127, on obtient les mêmes résultats à une concentration de 0 mg/l et 0,1 mg/l sur tabac sauvage et tabac CO.

b) test en serre:

On opère comme à l'exemple 4, si ce n'est que le traitement est effectué en prélevée, 24 heures avant le semis. Le semis sauvage s'effectue normalement. Dans ces conditions on observe que pour les semis témoins non traités, il n'y pas de germination pour toute dose d'herbicide au moins égale à 10 g/ha. Au contraire les tabacs CY ne présentent aucun symptôme, tel que défini au paragraphe a), jusqu'à 100 g/ha compris. De même les tabacs CO ne présentent aucun symptôme, tel que défini au paragraphe a) jusqu'à 200 g/ha compris.

20

Ces résultats montrent clairement que le gène de l'HPPD de *P. fluorescens* confère une tolérance au tabac contre les traitements en prélevée à l'isoxaflutole. Cette tolérance est meilleure si la protéine est localisée dans le chloroplaste au lieu du cytoplasme.

25

Exemple 6:

Dans le but d'étudier si le gène de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* peut être utilisé comme gène marqueur au cours du cycle "transformation - régénération" d'une espèce végétale, le tabac a été transformé avec le gène de l'HPPD et des plantes transformées ont été obtenues après sélection sur isoxaflutole.

30

Matériel et méthodes et résultats

Le gène chimérique pRP V décrit ci-dessous est transféré dans du tabac industriel PBD6 selon les procédures de transformation et de régénération déjà décrites dans la demande européenne EP n° 0 508 909.

- 5 Le gène chimère du vecteur pRP V a la structure suivante:

| | | | | |
|-----------------------------|-----|-----|--------------------------|---------------|
| Promoteur double histone | TEV | OTP | Région codante de l'HPPD | Termineur nos |
|-----------------------------|-----|-----|--------------------------|---------------|

1) Transformation:

- 10 Le vecteur est introduit dans la souche non oncogène d'*Agrobacterium* EHA 101 (Hood et al, 1987) porteuse du cosmide pTVK 291 (Komari et al, 1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh et al (1985).

2) Régénération:

- 15 La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30g/l de saccharose ainsi que 350 mg/l de cefotaxime et 1 mg/l d'isoxaflutole. Les explants foliaires sont prélevés sur des plants en serre ou in vitro et transformés selon la technique des disques foliaires (Science 1985, Vol 227, p.1229-1231) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu MS additionné de 30g/l de
- 20 saccharose contenant 0.05mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours et 1 mg/l d'isoxaflutole. Les pousses vertes formées au cours de cette étape sont ensuite développées par culture sur un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose et 1 mg/l d'isoxaflutole mais ne contenant pas d'hormone, pendant 10 jours. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur
- 25 un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucres et 1 mg/l d'isoxaflutole et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

- 30 Toutes les plantules obtenues selon ce protocole sont analysées par PCR avec des amorces spécifiques de l'HPPD de *P.fluorescens*. Cette analyse PCR a permis de confirmer que toutes les plantules ainsi obtenues ont bien intégré le gène de l'HPPD.

En conclusion, cet essai confirme que le gène de l'HPPD peut être utilisé comme gène marqueur et que, associé à ce gène, l'isoxaflutole peut être un bon agent de sélection.

35

Exemples 7 et 8 : Isolement du gène de l'HPPD d'Arabidopsis thaliana et du gène de l'HPPD de carotte (Daucus carotta)

- a) Construction des banques d'ADNc.
- 5 Des mRNAs extraits de jeunes plantules d'*Arabidopsis thaliana*, et des mRNAs extraits de cellules de carotte en culture, ont servi à construire deux banques d'ADNc dans le vecteur Uni Zap™ XR commercialisé par la société Stratagen, suivant le protocole préconisé par cette société.
- 10 b) Criblage des banques d'ADNc
- Ces deux banques ont été criblées à l'aide d'une sonde correspondant à un ADNc d'*Arabidopsis thaliana* de longueur partielle, obtenu via l'Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio, USA) et répertorié : EST clone N° 91B13T7. Ce clone est constitué d'environ 500 paires de bases dont seulement 228 avaient été séquencées par le MSU-DOE
- 15 Plant Research Laboratory dans le cadre du séquençage au hasard des ADNc d'*Arabidopsis thaliana*. Nous avons séquencé complètement les 500 paires de bases avant d'utiliser ce clone pour cribler nos banques d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* et de carotte à l'aide de la technique classique d'hybridation des plages de lyse (référence ?).
- 20 c) Un ADNc d'*Arabidopsis thaliana* (SEQ ID N° 2) correspondant à 1338 paires de bases a été obtenu. Cet ADNc possède un codon de début d'initiation de la traduction à la position 25 et un codon de fin de traduction à la position 1336. Cet ADNc est donc complet et code pour une protéine de 445 acides aminés.
- 25 d) Un ADNc de carotte (*Daucus carotta*) (SEQ ID N° 3) correspondant à 1329 paires de bases a été obtenu. Cet ADNc possède un codon de début d'initiation de la traduction à la position 1 et un codon de fin de traduction à la position 1329. Cet ADNc est donc complet et code pour une protéine de 442 acides aminés.

30 Les séquences illustrées sont les suivantes:

SEQ ID N° 1 Séquence du gène de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32.

SEQ ID N° 2

Séquence d'ADNc d'HPPD d'*Arabidopsis thaliana*

35

SEQ ID N° 3

séquence d'ADNc d'HPPD de *Daucus carotta*

Les figures ci-après sont données à titre indicatif pour illustrer l'invention.

La Figure 1 représente la séquence protéique de l'HPPD de *Pseudomonas sp.* strain P.J. 874 et la séquence nucléotidique théorique de la partie codante correspondante; les cinq oligonucléotides choisis pour faire l'amplification d'une partie de cette région codante sont symbolisés par les cinq flèches.

- 5 La Figure 2 représente la cartographie du plasmide avec le fragment d'ADN génomique de 7 kb contenant le gène de l'HPPD de *P. fluorescens* A32.

- La Figure 3 donne la comparaison des séquences en acides aminés de l' HPPD de *P. fluorescens* A32 et de l'HPPD de *Pseudomonas sp* strain P.J. 874 (seuls les acides aminés
10 divergents entre les deux séquences sont indiqués) ainsi que la séquence consensus.

Liste de séquences

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Sailland, Alain
Rolland, Anne
Matringe, Michel
Pallett, Kenneth E

(ii) TITLE OF INVENTION: SEQUENCE ADN D'UN GENE DE
L'HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE ET OBTENTION DE
PLANTES CONTENANT CE GENE DE L'HYDROXY-PHENYL PYRUVATE
DIOXYGENASE, RESISTANTES A CERTAINS HERBICIDES

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 3

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: Francois Chretien
(B) STREET: 14-20 rue Pierre BAIZET
(C) CITY: Lyon Cedex 09
(E) COUNTRY: France
(F) ZIP: 69263

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: FR PH95033
(B) FILING DATE: 02-JUN-1995
(C) CLASSIFICATION:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Chretien, Francois

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: 72-29-26-42
(B) TELEFAX: 72-29-28-43

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1077 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Pseudomonas fluorescens

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

| | |
|--|------|
| ATGGCAGATC TATACGAAA CCCAATGGGC CTGATGGGCT TTGAATTCAT CGAATTAGCG | 60 |
| TTCTTCAAGG TGGGTACCCCT GGAGCCGATC TTCGAGATCA TGGGCTTCAC CAAAGTCGCG | 120 |
| ACCCACCGTT CCAAGAACGT GCACCTGTAC CGCCAGGGCG AGATCAACCT GATCCTCAAC | 180 |
| AACGAGCCCA ACAGCATCGC CTCCTACTTT GCGGCCGAAC ACGGCCCGTC GGTGTGCGGC | 240 |
| ATGGCGTTCC GCGTGAAGGA CTCGAAAAG GCCTACAACC GCGCCCTGGA ACTCGGCGCC | 300 |
| CAGCCGATCC ATATTGACAC CGGGCCGATG GAATTGAACC TGCCGGCGAT CAAGGGCATC | 360 |
| GGCGGCGCGC CGTTGTACCT GATCGACCGT TTCGGCGAAG GCAGCTCGAT CTACGACATC | 420 |
| GACTTCGTGT ACCTCGAAGG TGTGGAGCGC AATCCGGTCG GTGCAGGTCT CAAAGTCATC | 480 |
| GACCACCTGA CCCACAACGT CTATCGCGGC CGCATGGTCT ACTGGGCCAA CTTCTACGAG | 540 |
| AAATTGTTCA ACTTCCGTGA AGCGCGTTAC TTCGATATCA AGGGCGAGTA CACCGGCCTG | 600 |
| ACTTCCAAGG CCATGAGTGC GCCGGACGGC ATGATCCGCA TCCCGCTGAA CGAAGAGTCG | 660 |
| TCCAAGGGCG CGGGGCGAGT CGAAGAGTTC CTGATGCAGT TCAACGGCGA AGGCATCCAG | 720 |
| CACGTGGCGT TCCTCACC GAACCTGGTC AAGACCTGGG ACGCGTTGAA GAAAATCGGC | 780 |
| ATGCGCTTCA TGACCGCGCC GCCAGACACT TATTACGAAA TGCTCGAAGG CCGCCTGCCT | 840 |
| GACCACGGCG AGCCGGTGGG TCAACTGCAG GCACGCGGTA TCCTGCTGGA CGGATCTTCC | 900 |
| GTGGAAGGCG ACAACGCCT GCTGCTGCAG ATCTTCTCGG AAACCTGAT GGGCCCGGTG | 960 |
| TTCTTCGAAT TCATCCAGCG CAAGGGCGAC GATGGGTTTG GCGAGGGCAA CTTCAAGGCG | 1020 |
| CTGTTGAGT CCATCGAAGG TGACCAGGTG CGTCGTGGTG TATTGACCGC CGATTAA | 1077 |

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1338 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Arabidopsis thaliana
- (B) STRAIN: Columbia
- (D) DEVELOPMENTAL STAGE: Young green plant

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

- (A) LIBRARY: Uni zap XR STRATAGENE

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

| | |
|---|-----|
| ATGGGCCACC AAAACGCCGC CGTTTCAGAG AATCAAAACC ATGATGACGG CGCTGCGTCG | 60 |
| TCGCCGGGAT TCAAGCTCGT CGGATTTTCC AAGTTCGTAA GAAAGAATCC AAAGTCTGAT | 120 |

| | |
|---|------|
| AAATTCAAGG TTAAGCGCTT CCATCACATC GAGTTCTGGT GCGGCGACGC AACCAACGTC | 180 |
| GTCGTCGCT TCTCTGGGG TCTGGGGATG AGATTCTCCG CCAAATCCGA TCTTTCACC | 240 |
| GGAAAGATGG TTCACGGCTC TTACCTACTC ACCTCCGGTG ACCTCCGATT CCTTTTCACT | 300 |
| GTCCTTACT CTCGCTCTCT CTCGCGCGGA GAGATTAAAC CGACAACCAC AGCTTCTATC | 360 |
| CCAAGTTTCG ATCACGGCTC TTGTCGTTCC TTCTTCTCTT CACATGGTCT CGGTGTTAGA | 420 |
| GCCGTTCGGA TTGAAGTAGA AGACGCAGAG TCAGCTTTCT CCATCAGTGT AGCTAATGGC | 480 |
| GCTATTCCTT CGTCGCCTCC TATCGTCCTC AATGAAGCAG TTACGATCGC TGAGGTTAAA | 540 |
| CTATACGGCG ATGTTGTTCT CCGATATGTT AGTTACAAAG CAGAAGATAC CGAAAAATCC | 600 |
| GAATTCTTGC CAGGGTTCGA GCGTGTAGAG GATGCGTCGT CGTCCCATC GGATTATGGT | 660 |
| ATCCGSCGGC TTGACCACGC CGTGGGAAAC GTTCCTGAGC TTGGTCCGGC TTTAACTTAT | 720 |
| GTAGCGGGGT TCACTGGTTT TCACCAATC GCAGAGTTCA CAGCAGACGA CGTTGGAACC | 780 |
| GCCGAGAGCG GTTTAAATC AGCGGTCCTG GCTAGCAATG ATGAAATGGT TCTTCTACCG | 840 |
| ATTAACGAGC CAGTGCACGG AACAAAGAGG AAGAGTCAGA TTCAGACGTA TTTGGAACAT | 900 |
| AACGAAGCG CAGGGCTACA ACATCTGGCT CTGATGAGTG AAGACATATT CAGGACCCTG | 960 |
| AGAGAGATGA GGAAGAGGAG CAGTATTGGA GGATTCGACT TCATGCCITC TCCTCCGCCT | 1020 |
| ACTTACTACC AGAATCTCAA GAAACGGGTC GGCGACGTC TCAGCGATGA TCAGATCAAG | 1080 |
| GAGTGTGAGG AATTAGGGAT TCTGTAGAC AGAGATGATC AAGGGACGTT GCTTCAAATC | 1140 |
| TTACAAAAC CACTAGGTGA CAGGCCGACG ATATTTATAG AGATAATCCA GAGAGTAGGA | 1200 |
| TGCATGATGA AAGATGAGGA AGGGAAGGCT TACCAGAGTG GAGGATGTGG TGGTTTTGGC | 1260 |
| AAAGGCAATT TCTCTAGCT CTTCAAGTCC ATTGAAGAAT ACGAAAAGAC TCTTGAAGCC | 1320 |
| AAACAGTTAG TGGGATGA | 1338 |

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1329 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: *Daucus carota*
- (D) DEVELOPMENTAL STAGE: Suspension cells

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

- (A) LIBRARY: Uni zap XR STRATAGENE

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

| | |
|---|----|
| ATGGGGAAAA AACAAATCGGA AGCTGAAATT CTCTCAAGCA ATTCATCAA CACCTCTCCT | 60 |
|---|----|

| | |
|--|------|
| GCAACATTCA AGCTGGTCGG TTCAACAAC TTCGTCCGCS CCAACCCCAA GTCCGATCAC | 120 |
| TTCCCCGTGA AGCGGTTCBA CCACATTGAG TTCTGGTGCG GCGACGCCAC CAACACGTCG | 180 |
| CGGCGGTTCT CGTGGGGCCT CGGCATGCCT TTGGTGGCGA AATCGGATCT CTCTACTGGA | 240 |
| AACTCTGTTC ACGCTTCTTA TCTTGTCGC TCGGCGAATC TCAGTTTCGT CTTACCGCT | 300 |
| CCTTACTCTC CGTCCACGAC CACTTCCTCT GGTTCAGCTG CCATCCCGTC TTTTTCGGCA | 360 |
| TCGGGTTTTC ACTCTTTTGC GGCCAAACAC GGCCTTGCTG TTCGGGCTAT TGCTCTTGAA | 420 |
| GTTGCTGACG TGGCTGCTGC GTTTGAGGCC AGTGTGCGC GTGGGGCCAG GCCGGCTTCG | 480 |
| GCTCCTGTTG AATTGGACGA CCAGGCGTGG TTGGCTGAGG TGGAGTTGTA CGGAGATGTG | 540 |
| GTCTTAGAGT TTGTTAGTTT TGGGAGGGAG GAGGGTTTGT TTTTGCCCTG ATTCGAGGCG | 600 |
| GTGGAGGGGA CGGCGTCGTT TCCGATTG GATTATGGAA TTAGAAGACT TGATCATGCG | 660 |
| GTGGGGAATG TTACCGAGTT GGGGCCTGTG GTGGAGTATA TTAAGGGTT TACGGGGTTT | 720 |
| CATGAATTG CGGAGTTTAC AGCGGAGGAT GTGGGGACTT TGGAGAGTGG GTTGAATTG | 780 |
| GTGGTGTGG CGAATAATGA GGAGATGGT CTGTTGCCCT TGAATGAGCC TGTGTATGGG | 840 |
| ACCAAGAGGA AGAGTCAGAT ACAGACTTAC TTGGAGCACA ATGAAGGGGC TGGAGTGCAG | 900 |
| CATTGGCTT TAGTGAGTGA GGATATTTT AGGACTTTAA GGGAGATGAG GAAGAGGAGT | 960 |
| TGCCTTGGTG GTTTTGAGT TATGCCTTCG CCACCGCCTA CGTATTACAA GAATTTGAAG | 1020 |
| AATAGGGTCG GGGATGTGTT GAGTGATGAA CAGATCAAGG AGTGTGAAGA TTTGGGGATT | 1080 |
| TTGGTGGATA GGGATGATCA GGGTACATTG CTTCAAATCT TTACCAAGCC TGTAGGTGAC | 1140 |
| AGGCCTACCT TATTCATAGA GATCATTGAG AGGGTAGGGT GCATGCTCAA GGACGATGCA | 1200 |
| GGGCAGATGT ACCAGAAGGG CGGGTGCGGA GGATTGTTGGA AGGGGAACTT CTCAGAGCTG | 1260 |
| TTCAAGTCCA TCGAAGAATA TGA AAAAACA CTTGAAGCTA AACAAATCAC TGGATCTGCT | 1320 |
| GCTGCATGA | 1329 |

Revendications

- 5
1. Séquence d'un gène d'origine non humaine ou d'une bactérie non marine, isolée ou séquence, pouvant s'hybrider avec cette séquence, caractérisé en ce qu'elle exprime une hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD).
 - 10 2. Séquence selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'elle est d'origine bactérienne ou de plante.
 3. Séquence selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'elle est issue de *Pseudomonas sp.*
 - 15 4. Séquence selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est issue de *Pseudomonas fluorescens*.
 5. Séquence selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'elle est d'origine végétale.
 - 20 6. Séquence selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'elle est issue d'*Arabidopsis*.
 7. Séquence selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'elle est issue d'une ombellifère.
 - 25 8. Procédé d'isolement du gène selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que:
 - on choisit, comme amorces, quelques oligonucléotides issus de la séquence en acides aminés d'une HPPD .
 - à partir de ces amorces, on synthétise des fragments d'amplification par PCR
 - on isole le gène par création et le criblage d'une banque génomique et
 - 30 - on clone le gène.
 9. Gène chimère pour la transformation génétique des plantes comprenant, dans le sens de la transcription:
 - au moins une séquence de régulation promotrice issue d'un gène s'exprimant
 - 35 naturellement dans les plantes,
 - une séquence codante hétérologue,
 - au moins une séquence de polyadénylation,

caractérisé en ce que la séquence codante est une séquence d'un gène qui exprime l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD).

- 5 10. Gène chimère selon la revendication 9, caractérisée en ce que la séquence de régulation promotrice favorise la surexpression de la séquence codante.
11. Gène chimère selon la revendication 10, caractérisé en ce que la séquence de régulation promotrice comprend au moins un promoteur d'histone.
- 10 12. Gène chimère selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend, entre la séquence de régulation promotrice et la séquence codante, un peptide de transit.
- 15 13. Gène chimère selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend, entre la séquence de régulation promotrice et la séquence codante, un peptide de transit optimisé comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale.
- 20 14. Gène chimère selon l'une des revendications 9 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend, entre la séquence de régulation promotrice et la séquence codante, une séquence d'un activateur de transcription (enhancer).
- 25 15. Vecteur utilisable pour la transformation génétique des plantes, caractérisé en ce qu'il comprend un gène chimère selon l'une des revendications 9 à 14.
- 30 16. Cellule végétale, caractérisée en ce qu'elle comprend un gène chimère selon l'une des revendications 9 à 14.
17. Plante, caractérisée en ce qu'elle est régénérée à partir de cellules selon la revendication 16.
- 35 18. Plante, selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle appartient à la famille des dicotylédones.

19. Procédé de transformation de plantes pour les rendre tolérantes aux inhibiteurs de l'HPPD, caractérisé en ce qu'on introduit dans la cellule végétale un gène exprimant un HPPD exogène.
- 5 20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le transfert est effectué avec *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*.
21. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le transfert est effectué par apport par bombardement à l'aide de particules chargées de l'ADN.
- 10 22. Procédé de transformation de plantes, caractérisé en ce qu'on introduit dans la cellule végétale un gène exprimant un HPPD exogène comme marqueur de sélection.
23. Procédé de traitement herbicide sélectif de plantes, caractérisé en ce qu'on applique un inhibiteur du gène l'HPPD à une plante selon l'une des revendications 17 et 18.
- 15 24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène de l'HPPD est un isoxazole.
- 20 25. Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que l'isoxazole est le 4-[4-CF₃-2-(méthylsulfoyl)benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole.
26. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène de l'HPPD est un dicétonitrile.
- 25 27. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène l'HPPD est une tricétone.
28. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène l'HPPD est la sulcotrione.
- 30

GCNGAYTNTAYGARAAYCCNATGG GNYTNATGGGNTTYGARTTYATHGA RYTNGCMWSNCCNACNCCNAAYACH 75
 A D L Y E N P M G L M G F E F I E L A S P T P N T
 YTNARGCCNATHHTTYGARATHATGG GNTTYACNAARGTNGCNACNCAVMG MWSNAARGAYGTNCAYYTNTAYMGN 150
 L E P I F E I M G F T K V A T H R S K D V H L Y R
 CARGGNGCNATHAAYTNTATHYTNA AYAAYGARCCNCAVWSNGTNGCNWS NTAYTTYGCNGCNGARCAYGGNCCN 225
 Q G A I N L I L N H E P H S V A S Y F A A E H G P
 WSNGTNTGYGGNATGGCNTTYMNG TNAARGAYWSNCARAARGCNTAYAA RMGNGCNYTNGARYTNGGNGCNCAR 300
 S V C G M A F R V K D S Q K A Y K R A L E L G A Q
 CCNATHCAYATHGARACNGGNCNA TGGARYTNAAYTNCNGCNATHAA RGGNATHGGNGGNGCNCNYTNTAY 375
 P I H I E T G P M E L N L P A I K G I G G A P L Y
 YTNATHGAYMNTTYGGNGARGGNW SMWSNATHAYGAYATHGAYTTYGT NTYYTNGARGGNGTNGAYMGNCAV 450
 K I D R F G E G S S I Y D I D F V F L E G V D R H
 CCNGTNGGNGCNGGNYTNAARATHA THGAYCAYTNAACNCAAYGTNTA YMGNGGNGNATGGCNTAYTGGGCN 525
 P V G A G L K I I D H L T H N V Y R G R M A Y W A
 AAYTTYTAYGARAARYTNTTYAAYT TYMNGGARATHMNTAYTTYGAYAT HAARGGNGARTAYACNGGNYTNACH 600
 N F Y E K L F N F R E I R Y F D I K G E Y T G L T
 WSNARGCNATGACNGCNCNGAYG GNATGATHMGNATHCCNYTNAAYGA RGARWSNWSNAARGGNGCNGGNCAR 675
 S K A M T A P D G M I R I P L N E E S S K G A G Q
 ATHGARGARTTYTNTATGCARTTYA AYGGNGARGGNATHCARCAYGTNGC NTYYTWSNGAYGAYTNTATHAAR 750
 I E E F L M Q F N G E G I Q H V A F L S D D L I K
 ACNTGGGAYCAYTNAARWSNATHG GNATGMNTTYATGACNGCNCNCNC NGAYACNTAYTAYGARATGYTNGAR 825
 T W D H L K S I G M R F M T A P P D T Y Y E M L E
 GGNMGNYTNCNAAYCAYGGNGARC CNGTNGGNGARYTNCARGCNMNGG NATHYTNTNGAYGGNWSNWSNGAR 900
 G R L P N H G E P V G E L Q A R G I L L D G S S E
 WSNGGNGAYAARMGNYTNTYTNC ARATHTTYWSNGARACNYTNTATGGG HCCNGTNTTYTGYARTTYATHCAR 975
 S G D K R L L L Q I F S E T L M G P V F F E F I Q
 MGNARGGNGAYGAYGGNTTYGGNG ARGGNAAYTTYAARGCNYTNTTYGA RWSNATHGARMGNGAYCARGTNMGN 1050
 R K G D D G F G E G N F K A L F E S I E R D Q V R
 MGNGGNGTYTWSNACNGAY 1071
 R G V L S T D

Fig 1

1 / 3

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

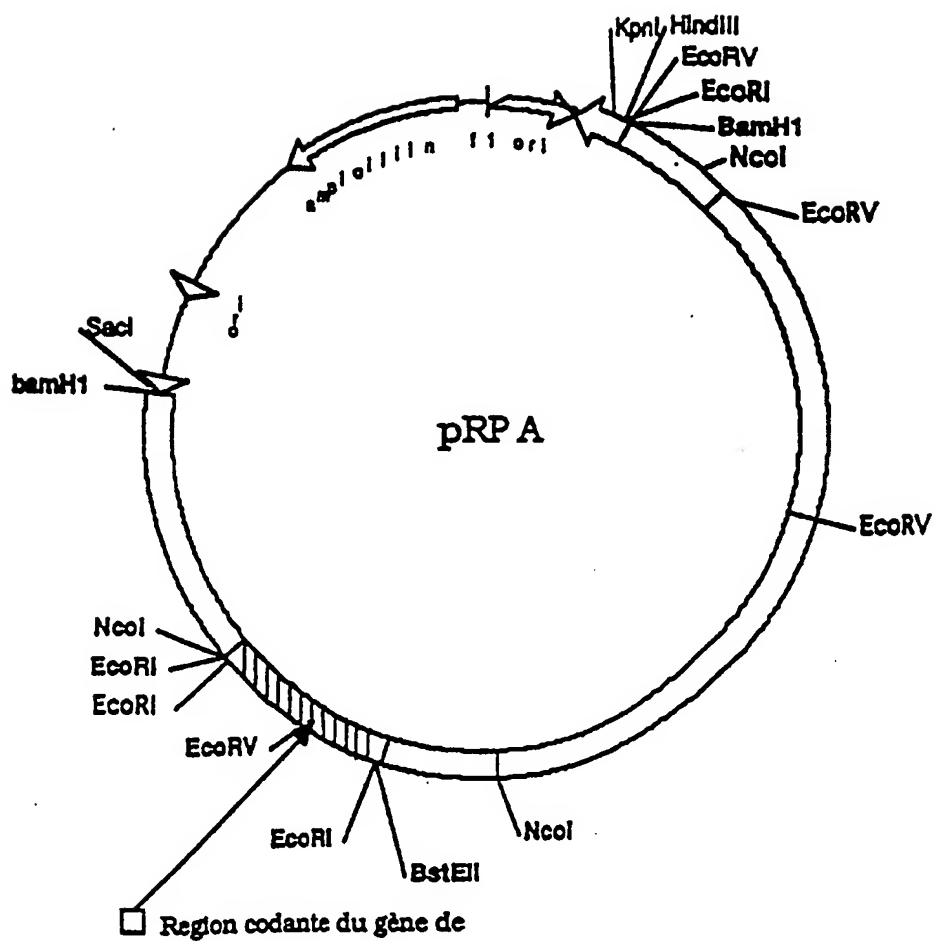


Fig 2

| | | | | | | |
|------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| Consensus | .ADLYENPMG | LMGFEFIE.A | SPTP.TLEPI | FEIMGFTKVA | THRSK.VHLY | 50 |
| <i>P. fluorescens</i> | M..... |F. |G..... | |N.... | 50 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | -..... |L. |N..... | |D.... | 49 |
| Consensus | RQG.INLILN | NEP.S.ASYF | AAEHGPSVCG | MAFRVKDSQK | AY.RALELGA | 100 |
| <i>P. fluorescens</i> | ...E..... | ...N.I.... | | | ..N..... | 100 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | ...A..... | ...H.V.... | | | ..K..... | 99 |
| Consensus | QPIHI.TGPM | ELNLPAIKGI | GGAPLYLIDR | FGEGSSIYDI | DFV.LEGV.R | 150 |
| <i>P. fluorescens</i> |D.... | | | | ...Y....E. | 150 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. |E.... | | | | ...F....D. | 149 |
| Consensus | .PVGAGLK.I | DHLTHNVYRG | RM.YNANFYE | KLFNFRE.RY | FDIKGEYTGL | 200 |
| <i>P. fluorescens</i> | N.....V. | | ..V..... |A.. | | 200 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | H.....I. | | ..A..... |I.. | | 199 |
| Consensus | TSKAM.APDG | MIRIPLNEES | SKGAGQIEEF | LMQFNAGEIQ | HVAFL.DDL. | 250 |
| <i>P. fluorescens</i> |S.... | | | |T...V | 250 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. |T.... | | | |S...I | 249 |
| Consensus | KTWD.LK.IG | MRFMTAPPDT | YYEMLEGRLP | .HGEPV..LQ | ARGILLDGSS | 300 |
| <i>P. fluorescens</i> |A..K.. | | | D.....DQ.. | | 300 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. |H..S.. | | | N.....GE.. | | 299 |
| Consensus | ..GDKRLLQ | IFSETLMGPV | FFEFIQRKGD | DGFGEGNFKA | LFESIERDQV | 350 |
| <i>P. fluorescens</i> | VE..... | | | | | 350 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | ES..... | | | | | 349 |
| Consensus | RRGVL..D | | | | | 358 |
| <i>P. fluorescens</i> |TÄ. | | | | | 358 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. |ST. | | | | | 357 |

Fig. 3